

ブラディキニンによる気道粘膜下腺からの分泌機序

著者	長岐 雅俊
号	2795
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/21281

氏 名（本籍） ^{なが}長 ^き岐 ^{まさ}雅 ^{とし}俊

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 7 9 5 号

学位授与年月日 平 成 7 年 9 月 13 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 62 年 3 月 14 日
岩手医科大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 Bradykinin-induced airway submucosal gland
secretion.
（ブラディキニンによる気道粘膜下腺からの分泌
機序）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 白 土 邦 男 教授 佐々木 英 忠

教授 貫 和 敏 博

論文内容要旨

研究目的

気道の過分泌は、気管支喘息をはじめとする気道の炎症性疾患において重要な病態の一つである。気道分泌は気道上皮の杯細胞及び気道粘膜下腺細胞により行われているが、ヒト気道では気道粘膜下腺細胞が主要な役割を果たしていると考えられている。一方 Bradykinin (BK) は重要な炎症性メディエーターのひとつで、肺においては気道平滑筋の収縮作用や血管透過性亢進作用を有し、また気管支喘息患者の血清中や気管支肺胞洗浄液中の BK 濃度が有意に上昇していることなどから、BK がその病態に大きく関与していると考えられている。しかしながら、気道粘膜下腺細胞からの水分と粘液糖蛋白質（ムチン）の分泌に及ぼす BK の影響については未だ知られていない。そこで本研究では気道粘膜下腺細胞からの分泌に及ぼす BK の影響について検索し、その分泌機序、とりわけ BK 受容体の役割及び細胞内機序を明らかにすることを目的とした。

方法

麻酔下に摘出したネコ気管及び呼吸器疾患以外で死亡した死後 4 時間以内の剖検から得られたヒト気管から実態顕微鏡下に気道粘膜下腺を摘出し、以下の実験に用いた。

1. 気道粘膜下腺細胞からのムチン分泌の測定

ムチンの前駆物質である [^3H]-glucosamine を $2.5 \mu\text{Ci/ml}$ 含む Medium199 中で 48 時間培養し、BK の刺激によって培養液中に分泌される [^3H] にラベルされたムチンを 10% トリクロロ酢酸、1% リンタングステン酸にて沈殿させ液体シンチレーションカウンターにて測定し、同時に進めたコントロール群と比較し、分泌指数 (Secretory index) として評価した。

2. 細胞膜電流応答の測定

単離した気道粘膜下腺をコラゲナーゼとトリプシンにて酵素処理することにより得られた 1 個から数個の粘膜下腺細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより、その細胞膜電流応答を測定した。0mV, -40mV, -80mV のそれぞれの保持電位における膜電流を連続的に記録した。電解質の組成から、0mV の膜電位では K^+ 電流を、-80mV の膜電位では Cl^- 電流を記録できることになり、また気道粘膜下腺では Cl^- 電流の動きが同時に水分の分泌を示すものと考えられている。

3. 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

2 と同様に酵素処理することにより得られた腺胞細胞を、 $2 \mu\text{M}$ の Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) 中で 30 分間 loading し Fura-2/AM を細胞内に取り込ませた。Loading さ

れた腺胞細胞を chamber 内にセットし 400 倍の視野で観察しつつ, auto filter changer を通して 360nm と 380nm の 2 波長を連続的に照射しその蛍光強度をカウントしそれぞれの蛍光強度の比 (F360/F380Ratio) を求め, これを Grynkiewicz らによって報告されている方法に適用し $[Ca^{2+}]_i$ を算出した。

結 果

1. BK は濃度依存性にムチンの分泌亢進をもたらしたが, B_2 -receptor antagonist はその分泌亢進作用を有意に抑制した。一方, B_1 -receptor antagonist は BK による分泌反応に影響を及ぼさなかった。また, nitric oxide inhibitor である L-NAME は BK による分泌促進反応を有意に抑制し, 更にその抑制効果は L-arginine を前処置することにより消失した。これらのことより, BK は気道粘膜下腺細胞の B_2 -receptor を介しムチンの分泌を促進させ, その反応は内因性の NO が関与していることが示された。

2. BK による腺胞細胞刺激により, 刺激直後より Cl^- 電流を示す内向きの電流が認められ, 更に K^+ 電流を示す外向きの電流が認められた。このことより, BK は気道粘膜下腺細胞からの水分の分泌を促すことが示された。

3. BK による刺激により $[Ca^{2+}]_i$ は一過性の上昇とそれに続く持続性の上昇を示した。外液の Ca^{2+} を除去すると, 初期の一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には有意な変化をもたらさなかったが, それに続く持続性の上昇は消失した。このことより, 初期の一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は細胞内 Ca^{2+} に, また持続性の上昇は細胞外 Ca^{2+} に依存していることが示された。更に, BK による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は B_2 -receptor antagonist により抑制されたが, B_1 -receptor antagonist は有意の影響を与えなかった。このことより, ネコ気道粘膜下腺細胞において, BK は B_2 -receptor に直接作用することにより $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をもたらすことが示された。

4. 以上得られた成績について, ヒトとネコとの間には有意な差異は認められなかった。

以上の結果より, 気道粘膜下腺において, BK は粘膜下腺細胞の B_2 -receptor を直接活性化しムチンと水分の分泌を亢進させ, またその反応には内因性の NO が関与していることが示唆された。更にその細胞内機序として, BK による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が考えられ, その上昇には細胞内ストアからの Ca^{2+} の放出と細胞外からの Ca^{2+} の流入が関与していることが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

気道の過分泌は気道閉塞や易感染性をもたらすので、その病態解明は気道の慢性炎症性疾患の新しい治療法の開発にとって重要である。気道の分泌は気道上皮の杯細胞及び気道粘膜下腺の両者が担っているが、ヒト気道では粘膜下腺が豊富にみられ、気道の分泌反応に主要な役割を果たしている。一方ブラディキニン (BK) は重要な炎症性メディエーターの1つで、その肺における作用として気道平滑筋の収縮作用や血管透過性の亢進作用を有することが知られている。また気管支喘息患者の血清中や気管支肺胞洗浄液中の BK 濃度が、正常人と比べ有意に上昇していること、更に喘息患者に BK を吸入させると気道収縮が惹起されることなどが報告され、BK がその病態に大きく関与していると考えられている。近年、BK の拮抗剤を開発し喘息の治療に応用しようという試みもなされつつある。しかしながら気管支喘息の重要な病態である気道過分泌に注目し、BK の気道分泌、すなわち粘膜下腺の分泌に及ぼす影響を検索し、その細胞内機序を明らかにした報告は未だ見あたらない。

本研究では剖検から得られたヒト気道粘膜下腺細胞と、ヒトと類似した粘膜下腺の分布を示すネコ粘膜下腺細胞を用い、 $[^3\text{H}]$ でラベルされたムチン分泌の測定、蛍光色素 Fura-2 を用いた細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定、パッチクランプ法を用いた細胞膜電流応答の測定 (粘膜下腺細胞からの水分の分泌を示す) を行い、その分泌機序を解明することを目的とした。その結果、次の事柄が明らかにされた。すなわち、1) BK は濃度依存性にムチン分泌の亢進をもたらし、その反応が B_2 -receptor antagonist で特異的に抑制され、更に BK による分泌亢進反応が Nitric oxide inhibitor である L-NAME によって抑制された。2) BK の腺房細胞刺激により Cl^- 電流が生じ、BK が水分の分泌を促すことが考えられた。3) BK 刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の一過性の上昇とそれに続く持続性の上昇がみられ、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は B_1 -receptor antagonist では影響を受けず、 B_2 -receptor antagonist により有意に抑制された。

以上の成績から、気道粘膜下腺の分泌反応において、 B_2 receptor が主要な役割を果たし、BK は B_2 receptor を直接活性化することによりムチンと水分の分泌を亢進させ、またその反応には内因性の NO が関与していることが示された。更にその分泌反応の細胞内機序として、細胞内ストアからの Ca^{2+} の放出と細胞外からの Ca^{2+} の流入の両者が関与していることが示された。

気道粘膜下腺における BK の影響とその細胞内機序について言及した研究は初めてであり、本研究での成績は今後、気管支喘息を含めた気道の慢性炎症性疾患の病態解明や治療法の開発にとって新しい知見となり得る。従って本論文は学位論文に充分値すると考えられる。